

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 09 855 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 101 09 855.3
⑳ Anmeldetag: 1. 3. 2001
㉑ Offenlegungstag: 12. 9. 2002

㉒ Int. Cl. 7:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/435
C 07 K 14/245
A 61 K 38/17
A 61 K 39/395
C 12 N 15/62
C 12 N 15/63
C 12 N 5/10

DE 101 09 855 A 1

- ㉓ Anmelder:
Stanislawski, Thomas, 65193 Wiesbaden, DE
- ㉔ Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen
- ㉕ Erfinder:
Schmitz, Frank, 54634 Bitburg, DE; Voß, Holger,
55218 Ingelheim, DE; Theobalt, Matthias, 55252
Mainz-Kastel, DE
- ㉖ Entgegenhaltungen:
WO 97 32 603 A1
Joint Meeting Immunology Düsseldorf
2000-Workshop R
(Posters) Workshop R Tumor Immunology. Chair:
R.M.
Toes (Leiden) und D.L.Schendel (München) vom 30.
November 2000, 14:45-17:45: zu finden unter der
Internetadresse: <http://www.uni-duesseldorf.de/dgf/i2000/contents/poster.htm> (zuletzt modifiziert am
29.November 2000);
Genbankeintrag CAA25595 (vom 3.Februar 1995)
mit
abgeleiteter Nukleinsäuresequenz,
Datenbankeintrag
No.X01134 (vom 3.Februar 1995) sowie

Sequenzver-
gleich mit Seq ID No.1;
Genbankeintrag CAA25594 (vom 21.März 1995) mit
ab-
geleiteter Nukleinsäuresequenz, Datenbankeintrag
No.X01133 (vom 21.März 1995) sowie Sequenzver-
gleich mit Seq ID No.2;
Genbankeintrag M22606 (vom 15.März 1995) mit
abge-
leiteter Nukleinsäuresequenz, sowie Sequenzver-
gleich mit Seq ID No.3;
Genbankeintrag CAA25255 (vom 10.Oktober 1995)
mit
abgeleiteter Nukleinsäuresequenz,
Datenbankeintrag
No.X00619 (vom 10.Oktober 1995) sowie
Sequenzver-
gleich mit Seq ID No.4;
Genbankeintrag CAA25255 (vom 10.Oktober 1995)
mit
abgeleiteter Nukleinsäuresequenz,
Datenbankeintrag
No.X00619 (vom 10.Oktober 1995)
sowie Sequenzvergle-
ich mit Seq ID No.5;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ㉗ Polypeptide eines p53-Protein-spezifischen murinen α/β T-Zell Rezeptors, diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung
- ㉘ Die Erfindung stellt Polypeptide eines p53-Protein-spezifischen T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder diese kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon zur Verfügung. Diese bewirken, daß p53-Protein-exprimierende Zellen von T-Zellen, die mit jenen Genen ausgestattet wurden, erkannt werden, Zytokine ausgeschüttet werden, und eine T-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.

DE 101 09 855 A 1

- [0001] Die Erfindung betrifft Polypeptide des eine p53-Protein-spezifische T-Zell-Antwort vermittelnden, murinen α/β -T-Zell-Rezeptors, diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung bei der Therapie, Diagnose und/oder Prävention von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.
- [0002] Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten (ZTL) ist entscheidend für die Erzeugung und Regulierung einer effektiven Immunantwort. Der charakteristische T-Zelllinien-Marker ist der T-Zell-Antigen-Rezeptor (TZR). Es gibt zwei definierte Typen von TZR: Einer ist ein Heterodimer von zwei Disulfid-verbundenen Polypeptiden (α und β); der andere ist zwar strukturell ähnlich, besteht jedoch aus γ - und δ -Polypeptiden. Beide Rezeptoren sind mit einem Set von fünf Polypeptiden dem CD3-Komplex assoziiert und bilden so zusammen den TZR-Komplex (TZR-CD3-Komplex). Der α/β -TZR ist der funktionell bedeutendste, da er in über 95% aller T-Zellen exprimiert wird.
- [0003] α/β -T-Zellen können in zwei verschiedene, sich überschneidende Populationen unterteilt werden: Eine Untergruppe, die den CD4-Marker trägt und hauptsächlich die Immunantwort unterstützt (T_H) und eine Untergruppe, die den CD8-Marker trägt und im wesentlichen zytotoxisch ist (T_C). CD8⁺-T-Zellen erkennen Antigene in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Solche Antigene können unter anderem tumorspezifische oder tumorassoziierte Peptidantigene sein. Nach Erkennung der Peptidantigene wird die betreffende Zelle abgetötet, indem die T-Zelle die Zielzelle lysiert und/oder Apoptose dieser Zielzellen induziert oder Zytokine (z. B. IL-2, IFN- γ) freisetzt.
- [0004] Unter den tumorassoziierten Peptidantigenen (TAA), die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, sind die sogenannten "universellen" TAA von besonderem Interesse. Diese TAA leiten sich überwiegend von zellulären Proteinen ab, die in normalen Zellen schwach exprimiert und in Tumorzellen überexprimiert werden. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das "p53"-Protein, dessen Expression in ungefähr 50% aller humanen, malignen Erkrankungen, insbesondere in einer Reihe solider Tumore, erhöht ist und dessen Umsatz im Sinne einer Proteasom-vermittelten Degradation und nachfolgender MHC-Klasse-I-assoziiierter Präsentation erhöht ist.
- [0005] Oligopeptide des p53-Proteins können im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden und repräsentieren attraktive Zielstrukturen für CD8-positive T-Zellen.
- [0006] Ein Ansatz für die Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren zur Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen ist die Identifizierung von Protein-spezifischen TZR. Solche TZR können unter bestimmten Voraussetzungen T-Zellen mit Antigenspezifität im allgemeinen und Tumor-Reaktivität im besonderen versehen, mit dem Ziel, daß diese T-Zellen die Remission und die Eradikation eines bestimmten Tumors herbeiführen.
- [0007] Weijtens et al. ("A retroviral vector system, 'STITCH', in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T-lymphocytes", 1998, Gene Therapy 5: 1995-1203) beschreiben ein retrovirales Vektorsystem zur Transduktion von Genen in aktivierte T-Lymphozyten. Dieses System wird verwendet, um die Expression von Antikörper-basierten, chimären Rezeptoren in der Membran von T-Zellen zu bewirken. Diese T-Zellen können dann gegen z. B. Nieren-Karzinomzellen eingesetzt werden. Mittels FACS-Analyse wird die Protein-Expression und damit der Erfolg der Vektor-Übertragung bestimmt, während Cytotoxizitäts-Tests Aufschluß über die erfolgreiche Expression und Funktion des chimären Rezeptors geben. Ähnlich beschreiben Eshhar et al. ("Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell-receptors", 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 720-724) die Herstellung von tumorspezifischen Lymphozyten und ihre Verwendung in der Immuntherapie auf der Basis von Chimären, die die variablen Regionen eines Antikörpers mit der konstanten Region des TZR umfassen. Diese chimären Gene konnten auf der Oberfläche von zytolytischen T-Zell-Hybridomen exprimiert werden und bewirkten die Ausschüttung von Interleukin-2 nach Kontakt mit dem Antigen.
- [0008] Clay et al. ("Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity", 1999, J. Immunology 163: 507-513) beschreiben die Isolierung von Genen der α -TZR- und β -TZR-Ketten eines MART-1(25-35)-spezifischen TZR und deren Expression in humanen, peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs). Die Lyse von verschiedenen Melanomzelllinien wird beschrieben.
- [0009] Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL", 2000, J. Immunol. 164, 3705-3712) beschreiben ein immuntherapeutisches Verfahren für Colon-Karzinomen unter der Verwendung von scFv-anti-CEA-Rezeptor-transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN. Das chimäre, spezifische Rezeptorkonstrukt wird über einen retroviralen Vektor in primäre Maus-T-Lymphozyten transduziert. Diese Zellen wurden in Mäuse injiziert (sogenannter adoptiver T-Zell-Transfer), die vorher mit Colon-Karzinomzellen beimpft waren.
- [0010] Aus Theobald et al. ("Targeting p53 as a general tumor antigen", 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11993-11997) ist die Herstellung von p53-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen nach der Injektion von Peptiden aus der Wildtyp-Sequenz von p53 bekannt. Mittels dieser T-Zelllinien konnte anschließend eine Auswahl von menschlichen Tumorzellen lysiert werden. Die Isolierung von Genen spezifischer TZRs der gegen p53 gerichteten, lytischen T-Zellen wird nicht beschrieben. Die WO 97/32603 beschreibt allgemein ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten T-Lymphozyten, die gegen Tumorgewebe gerichtete, spezifische TZRs exprimieren. Dabei wird eine ILA-transgene Maus (in diesem Fall HLA-A2.1) mit tumorassoziiertem Antigen immunisiert, um so die Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten zu bewirken, die spezifische TZRs auf ihrer Oberfläche exprimieren. Als tumorassoziierte Antigene werden Peptide verschiedener Gene, wie Her-2/neu, Ras, p53, Tyrosinase, MART, gp100, MAGE, BAGE und MUC-1 beschrieben. Aus den Her-2/neu-spezifischen T-Lymphozyten wird dann die Nukleotidsequenz, die mindestens eine variable Region der α - und β -Kette des entsprechenden, nicht menschlichen TZR enthält, isoliert und in verschiedenen genetischen (u. a. "humanisierten") TZR-Konstrukten verwendet. So beschreibt die WO 97/32603 Fusionsproteine von variablen Regionen von TZR mit der ζ -Region von CD3, CD8 oder CD16 sowie die Verwendung flexibler Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃.
- [0011] Ein spezifisch gegen das Oligopeptid der Aminosäuren 264-272 von p53 gerichteter TZR und dessen Verwendung wird jedoch durch die oben genannten Publikationen sowie in der übrigen Literatur weder erwähnt noch nahege-

legt.

[0012] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die murinen Gene der Ketten (α -TZR und β -TZR) eines neuen, effektiv gegen das p53-Protein gerichteten TZR zur Verfügung zu stellen. Diese bewirken, daß p53-Protein-exprimierende Zellen von T-Zellen, die mit jenen Genen ausgestattet wurden, erkannt werden. Zytokine ausgeschüttet werden und eine T-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.

[0013] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch das Polypeptid des eine p53-Protein-spezifische T-Zell-Antwort vermittelnden, murinen α/β -TZR gemäß SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon, insbesondere Substitutionen, Deletionen, Insertionen, Additionen, Inversionen und/oder chemische oder physikalische Modifikationen einer oder mehrerer Aminosäuren oder diese kodierende Nukleinsäuren, gelöst.

[0014] Aus einer einfach-A2.1-transgenen Maus ((A2.1 \times C57BL/6) \times C57BL/6)_{F1}) wurden die Gene der eine p53-Protein-spezifische T-Zell-Antwort vermittelnden, murinen α - oder β -TZR-Ketten isoliert, die eine HLA-A2.1-restringierte und gegen das Peptid der Aminosäuren 264–272 des p53-Proteins gerichtete, spezifische T-Zell-Antwort vermitteln. Die Polypeptide dieses TZR waren bisher unbekannt. Die Gene wurden als Wildtyp (WT) retroviral in humane, periphere Blut-Lymphozyten (PBLs) eingeschleust und die HLA-restringierte Antigen-Erkennung funktionell durch TZR-vermittelte, zytotoxische Lyse verschiedener Zell-Linien im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest überprüft. Zusätzlich zu der "regulären" β -TZR-Kette der vorliegenden Erfindung konnte eine Variante der β -TZR-Kette isoliert werden, die aufgrund von alternativer mRNA-Reifung entstanden ist (beschrieben bei Behlke und Loh, "Alternative splicing of murine T-cell-receptor β -chain transcripts", 1986, Nature 322.: 379–382). Die erhaltene T-Zell-Population war in der Lage, Peptid in nanomolaren Konzentrationen zu erkennen und effizient p53-Transfektanten und eine Varietät von A2.1-positiven, malignen Zellen abzutöten. Die erfindungsgemäßen Gene des p53-spezifischen TZR gehören nicht zu den bisher bekannten, geeigneten Materialien für die Diagnose – wie beispielsweise der Indikation – und/oder der Behandlung – wie beispielsweise der Modulation – von mit p53-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder für die Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, so daß sich aus dieser Erfindung völlig neue Therapieansätze ergeben.

[0015] Bei Liu et al. ("Targeting of human p53-overexpressing tumor cells by an HLA A*0201-restricted murine T-cell receptor expressed in Jurkat T Cells", 2000, Cancer Res. 60, 693–701) wird die Herstellung eines p53-spezifischen TZR auf der Basis von injizierten Peptiden beschrieben. Die erhaltenen T-Zellen werden als für die Immuntherapie von Krebs geeignet beschrieben. Der von Liu et al. beschriebene TZR ist jedoch gegen ein Peptid der Aminosäuren 149–157 von p53 gerichtet. Da das von den TZR erkannte Epitop des TAA für die therapeutische Wirkung und Nebenwirkungen von entscheidender Bedeutung ist, überrascht das Vorhandensein von weiteren effektiven und bisher unbekannten TZR, die gegen andere Peptide/Epitope des p53 gerichtet sind, umso mehr.

[0016] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, umfassend das erfindungsgemäße Polypeptid oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.

[0017] Das Fusionsprotein kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es die ζ -Region von CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, das einen flexiblen Linker umfaßt (Whitlow et al., "An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability", Prot. Engin. 6(8), pp. 989–995, 1993), insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGG)₃. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Fusionsprotein die ζ -Kette des CD3-Komplexes oder ITAM-Motive der ζ -Kette oder Teile davon umfassen, insbesondere die ζ -Kette von humanem CD3 oder Teile davon. Das Fusionsprotein kann weiterhin dadurch gekennzeichnet sein, daß es CD8 α oder das Lck-Bindungsmotiv von CD8 α umfaßt oder Teile davon, insbesondere von humanem CD8 α .

[0018] Bei dem erfindungsgemäßen Fusionsprotein kann es sich weiterhin um eine chimäre, partiell oder vollständig humanisierte α - und/oder β -TZR-Kette handeln. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, bei dem es sich um einen Einzelketten-TZR handelt. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, das einen flexiblen Linker umfaßt, insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGG)₃. Das erfindungsgemäße Fusionsprotein kann aber auch dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich um einen α/β -TZR handelt.

[0019] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, z. B. in einer geeigneten Wirtszelle, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure verwendet wird.

[0020] Hergestellt werden hierbei Fusionsproteine, die die oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion eines Polypeptids der Erfindung aufweisen oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion funktionell aktiv ist. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von ca. 1–200, vorzugsweise ca. 1–150, insbesondere ca. 1–100, vor allem ca. 1–50 fremden Aminosäuren. Beispiele solcher Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, die z. B. aus der Galactosidase von E. coli abgeleitet sein können. Weiterhin können auch virale Peptidsequenzen, wie zum Beispiel vom Bakteriophagen M13 verwendet werden, um so Fusionsproteine für das dem Fachmann bekannte "phage display"-Verfahren zu erzeugen.

[0021] Zur Aufreinigung der erfindungsgemäßen Proteine kann ein weiteres/weiterer Polypeptid("tag") angefügt sein. Erfindungsgemäße Protein-tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern, ohne den Komplex in nennenswertem Maße zu eluieren und anschließend gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele der dem Fachmann bekannten Protein-tags sind ein (His)₆-tag, ein Myc-tag, ein FLAG-tag, ein Strep-tag, ein Strep-tag II, ein Hämagglutinin-tag, Glutathion-Transferase(GST)-tag, Intein mit einem Affinitäts-Chitin-binding-tag oder Maltose-bindendes Protein(MBP)-tag. Diese Protein-tags können sich N-, C-terminal und/oder intern befinden.

[0022] Neben den aus Zellen isolierten, natürlichen Polypeptiden können alle erfindungsgemäßen Polypeptide oder deren Teile unter zellfreien Bedingungen hergestellt worden sein, z. B. durch Synthese oder durch in-vitro-Translation. So

kann das gesamte Polypeptid oder Teile davon zum Beispiel mit Hilfe der klassischen Synthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

- 5 **[0023]** Die Erfindung betrifft auch Polypeptide, die Derivate eines Antikörpers mit Spezifität für das p53-Peptidantigen (AA 264-272), vorzugsweise präsentiert im Kontext von HLA-A2.1, sind.
- [0024]** Weiterhin umfaßt die Erfindung retro-inverse Peptide oder Pseudopeptide gemäß der Polypeptidsequenz der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktionelle Varianten oder Teile davon. Diese Peptide weisen anstelle der -CO-NH-Peptidbindungen -NH-CO-Bindungen auf.
- 10 **[0025]** Die Aufgabe der Erfindung wird weiterhin durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure gelöst, die eine DNA, RNA, PNA (Peptide nucleic acid) oder p-NA (Pyranosyl nucleic acid), vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA ist, mit einer Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 12 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden ist. Die Nukleinsäure kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist. Sie kann auch in Form ihrer antisense-Sequenz vorliegen.
- 15 **[0026]** Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit dem ersten in einer Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1987, "Nucleic. Acids Res.", 15: 8125-48) liegenden Start-Codon (ATG) bis zum nächsten Stop-Codon (TAG, TGA bzw. TAA), das im gleichen Leseraster zum ATG liegt. Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen ist die Konstruktion von antisense-Oligonukleotiden (Zheng und Kemeny 1995, "Clin. Exp. Immunol.", 100: 380-382; Nellen und Lichtenstein 1993, "Trends Biochem. Sci.", 18: 419-23) und/oder Ribozymen (Amarzguiou et al. 1998, "Cell. Mol. Life Sci.", 54: 1175-202; Vaish, et al. 1998, "Nucleic Acids Res.", 26: 5237-42; Persidis 1997, "Nat. Biotechnol.", 15: 921-2; Couture und Stinchcomb 1996, "Trends Genet.", 12: 510-5). Mit "antisense"-Oligonukleotiden kann man die Stabilität der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verringern und/oder die
- 25 Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren. So kann beispielsweise die Expression der entsprechenden Gene in Zellen sowohl in vivo als auch in vitro verringert werden. Oligonukleotide können sich daher als Therapeutikum eignen. Diese Strategie eignet sich beispielsweise auch für Haut, epidermale und dermale Zellen, insbesondere, wenn die "antisense"-Oligonukleotide mit Liposomen komplexiert werden (Smyth et al. 1997, "J. Invest. Dermatol.", 108: 523-6; White et al. 1999, "J. Invest. Dermatol.", 112: 699-705; White et al. 1999, "J. Invest. Dermatol.", 112: 887-92). Für die
- 30 Verwendung als Sonde oder als "antisense"-Oligonukleotid ist eine einzelsträngige DNA oder RNA bevorzugt.
- [0027]** Neben den aus Zellen isolierten, natürlichen Nukleinsäuren können alle erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder deren Teile auch synthetisch hergestellt worden sein. Weiterhin kann zur Durchführung der Erfindung eine Nukleinsäure verwendet werden, die synthetisch hergestellt worden ist. So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure beispielsweise chemisch anhand der in den von SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 beschriebenen Proteinsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes, z. B. nach der Phosphotriester-Methode, synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann und Peymann 1990, "Chemical Reviews", 90: 543-584).
- 35 **[0028]** Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- oder Exonukleasen, insbesondere durch in der Zelle vorkommende DNasen und RNasen, abgebaut. Deshalb ist es vorteilhaft, die Nukleinsäure zu modifizieren, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so daß über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration der Nukleinsäure in der Zelle beibehalten wird (Beigelman et al. 1995, "Nucleic Acids Res.", 23: 3989-94; Dudycz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehreren Internukleotid-Phosphatgruppen oder durch die Einführung einer oder mehrerer Nicht-Phosphor-Internukleotide erhalten werden.
- 40 **[0029]** Geeignete, modifizierte Internukleotide sind in Uhlmann und Peymann (1990, "Chem. Rev.", 90: 544) zusammengefaßt (siehe auch Beigelman et al. 1995, "Nucleic Acids Res.", 23: 3989-94; Dudycz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Modifizierte Internukleotid-Phosphatreste und/oder Nicht-Phosphoresterbindungen in einer Nukleinsäure, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphoramidat, Phosphorodithioat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxanbrücken, Carbonatbrücken, Carboxymethylester, Acetamidabridgen und/oder Thiobridgen enthalten. Es ist auch beabsichtigt, daß diese Modifizierung die Haltbarkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden kann, verbessert.
- 45 **[0030]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle-Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, adenoviralen Vektors, retroviralen Vektors (Miller, et al. "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression", BioTechniques Vol. 7, No. 9, p. 980, 1989) und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.
- 50 **[0031]** So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten sein. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame Vektor T-Zellspezifische, regulatorische Sequenzen, die funktionell mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verbunden sind. Die Expressionsvektoren können prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in E. coli z. B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in Saccharomyces cerevisiae z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. 1994, "Nucleic. Acids Res.", 22: 5767-5768), für die Expression in Insektenzellen, z. B. Baculovirus-Vektoren, wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen, z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.
- 65 **[0032]** Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in E. coli (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den Met-25-, GAL-1- oder ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. 1983, "J. Biol. Chem.", 258: 2674-2682; Mumberg, supra), den Ba-

culovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839). Für die Expression in Säugetierzellen sind beispielsweise Promotoren geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen erlauben. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer und/oder Repressorsequenzen. Beispiel für geeignete, regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA-Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40-Promotor oder LTR-Promotoren, z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. 1981, Nature 214: 228-232) und weitere, virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV. Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen et al. 1994, "Curr. Opin. Biotechnol.", 5: 516-20).

[0033] Beispiele für regulierbare Elemente, die T-Zell-spezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in diesen Zelltypen exprimiert werden.

[0034] Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren folgender Gene: cdc25, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myc oder DHFR (Zwicker und Müller 1997, "Trends Genet.", 13: 3-6). Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolischspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glukosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

[0035] Der erfindungsgemäße Vektor kann zur Transfektion einer Wirtszelle verwendet werden, bei der es sich bevorzugterweise um eine T-Zelle handelt. Besonders bevorzugt ist eine Wirtszelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie auf ihrer Oberfläche ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Fusionsprotein exprimiert.

[0036] Um die Einführung von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen oder nicht-viralen Vektors vorliegen. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Retroviren, Baculoviren, Vakziniaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht-virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide oder poly-Lysin-konjugierte DNA.

[0037] Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, beispielsweise Adenovirusvektoren oder retrovirale Vektoren (Lindemann et al., 1997, "Mol. Med.", 3: 466-76; Springer et al. 1998, "Mol. Cell.", 2: 549-58).

[0038] Ein bevorzugter Mechanismus, erfindungsgemäße Polypeptide in vivo zur Expression zu bringen, ist der virale Gen-Transfer, insbesondere mit Hilfe retroviraler Partikel. Diese werden vorzugsweise genutzt, entsprechende Zielzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, des Patienten ex vivo mit den für erfindungsgemäße Polypeptide kodierenden Genen oder Nukleotidsequenzen durch Transduktion zu versehen. Die Zielzellen können daraufhin im Sinne eines adoptiven Zelltransfers wieder in den Patienten reinfundiert werden, um mit der de-novo-eingefügten Spezifität tumorizide und/oder immunmodulierende Effektorfunktionen zu übernehmen. Jüngst wurden auf diesem Wege sehr gute gentherapeutische Erfolge in der Behandlung der durch Immuninkompetenz gekennzeichneten SCID-X1-Krankheit bei Neugeborenen erzielt, in dem hämatologische Vorläuferzellen mit einem analogen, intakten Transgen einer in den Kindern vorkommenden, nicht-funktionellen, mutierten Variante des γ -Kettengens, das für die Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist, retroviral versehen wurden (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

[0039] Weiterhin besteht die Möglichkeit, den Gentransfer in vivo durchzuführen, einerseits durch präferentiell stereotaktische Injektion der infektiösen Partikel, andererseits durch direkte Applikation von Viren-produzierenden Zellen (Oldfield, et al. "Hum. Gen. Ther.", 1993, 4: 39-69).

[0040] Die zum Transfer von Genen häufig eingesetzten, viralen Vektoren sind nach heutigem Stand der Technik vorwiegend retrovirale, lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte, virale Vektoren. Diese sind von natürlichen Viren abgeleitete, zirkuläre Nukleotidsequenzen, in denen zumindest die viralen Strukturprotein-kodierenden Gene durch das zu transferierende Konstrukt ausgetauscht werden.

[0041] Retrovirale Vektorsysteme schaffen die Voraussetzung für eine langhaltende Expression des Transgens durch die stabile, aber ungerichtete Integration in das Wirtsgenom. Vektoren der jüngeren Generation besitzen keine irrelevanten und potentiell immunogenen Proteine; des weiteren gibt es keine vorbestehende Immunität des Empfängers gegenüber dem Vektor. Retroviren enthalten ein RNA-Genom, das in eine Lipidhülle verpackt ist, die aus Teilen der Wirtszellmembran und Virusproteinen besteht. Zur Expression viraler Gene wird das RNS-Genom revers transkribiert und mit dem Enzym Integrase in die Zielzell-DNS integriert. Diese kann daraufhin von der infizierten Zelle transkribiert und translatiert werden, wodurch virale Bestandteile entstehen, die sich zu Retroviren zusammenfügen. RNS wird ausschließlich dann in die neu entstandenen Viren eingefügt. Das Genom der Retroviren besitzt drei essentielle Gene: gag, das für virale Strukturproteine, sogenannte gruppenspezifische Antigene kodiert; pol für Enzyme, wie Reverse Transkriptase und Integrase, und env für das Hüllprotein ("envelope"), das für die Bindung des wirtsspezifischen Rezeptors verantwortlich ist. Die Produktion der replikationsinkompetenten Viren findet nach Transfektion in sogenannten Verpackungszelllinien statt, die zusätzlich mit den gag/pol-kodierenden Genen ausgestattet wurden und diese "in trans" exprimieren und somit die Ausbildung replikationsinkompetenter (d. h. gag/pol-deletierter), transgener Viruspartikel komplexieren. Eine Alternative ist die Cotransfektion der essentiellen Virusgene, wobei nur der das Transgen enthaltende Vektor das Verpackungssignal trägt.

[0042] Die Separation dieser Gene ermöglicht einerseits die beliebige Kombination des gag/pol-Leserahmens mit aus verschiedenen Stämmen gewonnenen env-Leserahmen, wodurch Pseudotypen mit verändertem Wirtstropismus entstehen; andererseits kann dadurch die Bildung replikationskompetenter Viren innerhalb von Verpackungszellen drastisch reduziert werden. Das aus "gibbon ape leukemia virus" (GALV) abgeleitete Hüllprotein, das im vorliegenden Fall Verwendung findet, ist in der Lage, humane Zellen zu transduzieren und ist in der Verpackungszelllinie PG13 mit amphotropem Wirtsbereich etabliert (Miller et al., 1991). Zusätzlich wird die Sicherheit durch selektive Deletion von nicht-es-

sentiellen Virussequenzen zur Verhinderung einer homologen Rekombination und somit der Produktion replikationskompetenter Partikel erhöht.

[0043] Neue, nicht-virale Vektoren bestehen aus autonomen, sich selbst integrierenden DNS-Sequenzen, den Transposonen, die durch z. B. liposomale Transfektion in die Wirtszelle eingeschleust werden und erstmals erfolgreich zur Expression humaner Transgene in Säugerzellen eingesetzt wurden (Yant et al., 2000).

[0044] Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Hautzellen, erreicht werden kann (Alexander und Akhurst 1995, "Hum. Mol. Genet.", 4: 2279-85). Bei der Lipofektion werden kleine, unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche, neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr et al. 1989, "Proc. Natl. Acad. Sci.", USA 86: 6982-6986; Felgner et al. 1994, "J. Biol. Chem.", 269: 2550-2556; Gao und Huang, 1991, "Biochim. Biophys. Acta", 1189: 195-203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transfer von Nukleinsäuren in die Zelle erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al. 1999, "Gene-Therapy", 6: 282; Brandén et al. 1999, "Nature Biotech.", 17: 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Cytoplasma der Zelle ermöglichen (Kiehler et al 1997, "Bioconj. Chem.", 8: 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peymann 1990, supra). Eine andere besonders geeignete Form von gentherapeutischen Vektoren läßt sich dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure auf Goldpartikeln aufbringt und diese mit Hilfe der sogenannten "Gene Gun" in Gewebe, bevorzugt in die Haut, oder Zellen schießt (Wang et al., 1999, "J. Invest. Dermatol.", 112: 775-81).

[0045] Für die gentherapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nukleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere, nicht kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40-Virus-polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens, enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA erreicht werden kann (Jackson 1993, "Cell", 74: 9-14 und Palmiter et al. 1991, "Proc. Natl. Acad. Sci.", USA 88: 478-482).

[0046] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder einem anderen erfindungsgemäßen Genkonstrukt transformiert ist. Wirtszellen können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen sein, Beispiele für prokaryotische Wirtszellen sind E. coli und für eukaryotische Zellen Saccharomyces cerevisiae oder Insektenzellen.

[0047] Eine besonders bevorzugte, transformierte Wirtszelle ist eine transgene T-Vorläuferzelle oder eine Stammzelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt. Verfahren zur Transformation von Wirtszellen und/oder Stammzellen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen zum Beispiel Elektroporation, Mikroinjektion oder Transduktion. Eine besonders bevorzugte, transformierte Wirtszelle ist eine patienteneigene T-Zelle, die nach der Entnahme mit einem erfindungsgemäßen Genkonstrukt transfiziert oder transduziert wird. Erfindungsgemäße Wirtszellen können insbesondere dadurch erhalten werden, daß dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen, entnommen werden, die dann ex vivo mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen, genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden, um so erfindungsgemäße Wirtszellen zu erhalten. Die ex vivo generierten, spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten reimplantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL", J. Immunol. 2000, 164: 3705-3712) beschriebenen Verfahren unter der Verwendung von scFv-anti-CEA-Rezeptor-transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN.

[0048] Ein weiteres bevorzugtes, erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung von p53-Protein-spezifischen Antigenen ist dadurch gekennzeichnet, daß p53-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer erfindungsgemäßen Wirtszelle unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysieren, wenn der Tumor das p53-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das exprimierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.

[0049] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers, zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder funktioneller Äquivalente davon oder Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure immunisiert wird.

[0050] Das Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugtiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon oder diese(s) kodierende Nukleinsäure(n), gegebenenfalls in Anwesenheit von z. B. inkomplettem Freund'schem Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (siehe z. B. Diamond et al. 1981, "The New England Journal of Medicine", pp. 1344-1349). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen, polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über Säulenchromatographie reinigen. Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (1991, "Nature", 349: 293-299) hergestellt werden.

[0051] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper zur Diagnose, Prognose und Therapie-Optimierung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Sub-

stanzen, der gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet ist und mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden spezifisch reagiert, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Kopplung an geeignete Träger, wie z. B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können. Dieser Antikörper ist entweder polyklonal oder monoklonal; bevorzugt ist ein monoklonaler Antikörper. Unter dem Begriff Antikörper versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung auch gentechnisch hergestellte und gegebenenfalls modifizierte Antikörper bzw. antigenbindende Teile davon, wie z. B. chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, multifunktionelle Antikörper, bi- oder oligospezifische Antikörper, einzelsträngige Antikörper, F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmente (siehe z. B. EP-B1-0 368 684, US 4.816.567, US 4.816.397, WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884). Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Diagnose, Therapie-Überwachung und/oder Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen verwendet werden.

[0052] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

[0053] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein nach diesem Verfahren hergestelltes Arzneimittel zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung dieses Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

[0054] Die Therapie der mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen kann auf herkömmliche Weise, z. B. durch Infusionen oder Injektionen erfolgen, die die erfindungsgemäßen Arzneimittel enthalten. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann weiterhin gegebenenfalls in Form von Liposomenkomplexen bzw. Goldpartikelkomplexen erfolgen. Die Behandlung mittels der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann aber auch über orale Dosierungsformen, wie z. B. Tabletten oder Kapseln, über die Schleimhäute, zum Beispiel der Nase oder der Mundhöhle, oder in Form von unter die Haut implantierten Dispositoren erfolgen. Transdermale, therapeutische Systeme sind zum Beispiel aus den EP 0 944 398 A1, EP 0 916 336 A1, EP 0 889 723 A1 oder EP 0 852 493 A1 bekannt. Die erfindungsgemäßen (Poly)peptide und deren Derivate können auch dazu eingesetzt werden, Patienten mit Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, die mit p53 in Zusammenhang stehen, gezielt immunkompetent zu machen, um die Induktion, Erzeugung und Expansion von p53.264-272-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten zu erreichen und die Tumor- und Leukämiezellen der betreffenden Patienten spezifisch abzutöten. Solche Erkrankungen umfassen zum Beispiel solide Tumorerkrankungen, lymphohämatopoetische Neoplasien, maligne, hämatologische Erkrankungen oder Blastenschübe. [0055] Bei einer besonders bevorzugten Art der Behandlung wird dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen, entnommen, die dann ex vivo mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen, genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden. Die ex vivo generierten, spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten reinfundiert oder transplantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL", 2000, "J. Immunol.", 164: 3705-3712) beschriebenen, immunotherapeutischen Verfahren bei Colon-Karzinomen unter der Verwendung von scFv-anti-CEA-Rezeptor-transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN.

[0056] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

[0057] Unter dem Begriff "funktionelle Interaktoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind alle diejenigen Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Stoffgemische zu verstehen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptiden oder Antikörpern, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, unter geeigneten Bedingungen in Wechselwirkung treten können. Mögliche Interaktoren sind einfache chemische, organische oder anorganische Moleküle oder Verbindungen, können aber auch Peptide, Proteine oder Komplexe davon umfassen. Die funktionellen Interaktoren können aufgrund ihrer Wechselwirkung die Funktion(en) der Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper in vivo oder in vitro beeinflussen oder auch nur an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper binden oder mit ihnen andere Wechselwirkungen kovalenter oder nicht-kovalenter Weise eingehen.

[0058] Die Erfindung umfaßt weiterhin einen erfindungsgemäß hergestellten Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Oft kann so das pathologische Verhalten der Zellen in vitro nachgeahmt werden, und es können Substanzen gesucht werden, die das normale Verhalten der Zellen wieder herstellen und die ein therapeutisches Potential besitzen. Zudem läßt sich dieses Testsystem zum Screening von Substanzen ausnutzen, die eine Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem funktionellen Interaktor inhibieren.

[0059] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel zur Indikation, wie z. B. Diagnose und Therapie, von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert wird.

[0060] Als Therapeutika und/oder Prophylaktika kommen insbesondere Impfstoffe, rekombinante Partikel oder Injektionen oder Infusionslösungen in Betracht, die als Wirkstoff (a) das erfindungsgemäße TZR-Polypeptid und/oder seine Derivate und/oder (b) eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten und/oder (c) in vitro oder ex vivo erzeugte T-Lymphozyten, die einen spezifisch gegen p53.264-272 gerichteten TZR enthalten.

[0061] Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel und/oder rekombinanter

Partikel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen, gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen bzw. Goldpartikeln komplexierter Form enthält. Der pharmazeutische Träger ist beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ca. 6,0–8,0, vorzugsweise von ca. 6,8–7,8. Insbesondere von ca. 7,4 und/oder einer Osmolarität von ca. 200–400 milliosmol/Liter, vorzugsweise von ca. 290–310 milliosmol/Liter. Zusätzlich kann der pharmazeutische Träger geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner, wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe, enthalten.

[0062] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen in einer geeigneten Wirtszelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine erfindungsgemäße Nukleinsäure auf geeignete Weise exprimiert wird.

[0063] Das Polypeptid wird so beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die E.-coli-Stämme DHS, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzelllinien, z. B. von *Spodoptera frugiperda*, oder die tierischen Zellen COS, Vero, 293, HaCaT und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

[0064] Ein erfindungsgemäßes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen, immunologisch wirksamen Teile davon. Das Polypeptid bzw. die Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z. B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit, z. B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikörpern oder Tumor- und Leukämiezellen reagieren zu können. Der Antikörper-Antigen-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, z. B. Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert, oder um eine andere, geeignete Markierung. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

[0065] Ein anderes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid in einer erhöhten Menge vorhanden ist, um dadurch mit p53-Protein in Zusammenhang stehende Erkrankungen zu diagnostizieren und Hinweise zum Therapie-Erfolg zu erhalten. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Antigen-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

[0066] Ein weiteres, erfindungsgemäßes Diagnostikum umfaßt eine Sonde, vorzugsweise eine DNA-Sonde, und/oder Primer. Dies eröffnet eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, zum Beispiel durch die Isolierung aus einer geeigneten Genbank anhand einer geeigneten Sonde, zu erhalten (siehe z. B. Sambrook et al. 1989, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY Kapitel 8, Seite 8.1 bis 8.81; Kapitel 9, Seite 9.47 bis 9.58 und Kapitel 10, Seite 10.1 bis 10.67).

[0067] Als Sonde eignen sich beispielsweise DNA- oder RNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100–1000 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200–500 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300–400 Nukleotiden, deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 des Sequenzprotokolls abgeleitet werden kann.

[0068] Alternativ können anhand der abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen Oligonukleotide synthetisiert werden, die sich als Primer für eine Polymerase Kettenreaktion eignen. Als Primer eignen sich beispielsweise DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 10–100 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 15 bis 50 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von 20–30 Nukleotiden, deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 des Sequenzprotokolls anhand der entsprechenden cDNA-Sequenzen gemäß dem genetischen Code abgeleitet werden kann.

[0069] Der Begriff "kodierende Nukleinsäure" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die für ein isolierbares, bioaktives, erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Precursor kodiert. Das Polypeptid kann durch eine Sequenz in voller Länge oder jeden Teil der kodierenden Sequenz kodiert werden, solange die spezifische, beispielsweise enzymatische Aktivität erhalten bleibt.

[0070] Es ist bekannt, daß kleine Veränderungen in der Sequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren vorhanden sein können, zum Beispiel durch die Degenerierung des genetischen Codes, oder daß nicht-translatierte Sequenzen am 5'- und/oder 3'-Ende der Nukleinsäure angehängt sein können, ohne daß dessen Aktivität wesentlich verändert wird. Diese Erfindung umfaßt deshalb auch sogenannte "funktionelle Varianten" der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

[0071] Mit dem Begriff "funktionelle Varianten" sind alle DNA-Sequenzen bezeichnet, die komplementär zu einer DNA-Sequenz sind, die unter stringenten Bedingungen mit einer abgeleiteten Referenzsequenz oder Teilen davon, insbesondere der hypervariablen V(D)J-Region, hybridisieren und eine zu dem entsprechenden, erfindungsgemäßen Polypeptid ähnliche oder identische Aktivität aufweisen.

[0072] Unter "stringenten Hybridisierungsbedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung bei 60°C in 2,5 x SSC-Puffer, gefolgt von mehreren Waschschritten bei 37°C in einer geringeren Pufferkonzentration erfolgt und stabil bleibt.

[0073] Unter dem Begriff "funktionelle Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden verwandt sind, d. h. Strukturmerkmale der Polypeptide aufweisen. Beispiele funktioneller Varianten sind die entsprechenden Polypeptide, die aus anderen Organismen als der Maus, also dem Menschen, bzw. vorzugsweise aus nicht menschlichen Säugetieren, wie z. B. Affen, Schweinen und Ratten oder auch Vögeln, z. B. Hühnern, stammen. Andere Beispiele funktioneller Varianten sind Polypeptide, die durch unterschiedliche Allele des Gens in verschiedenen Individuen oder in verschiedenen Organen eines Organismus kodiert werden. Funktionelle Varianten im Sinne der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Polypeptide, die das gleiche Epitop

des p53-Proteins erkennen, wie der TZR der vorliegenden Erfindung. Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität, von ca. 70%, vorzugsweise ca. 80%, insbesondere ca. 90%, vor allem ca. 95%, zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß einer der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 und/oder zu anhand der Peptidsequenzen abgeleiteten DNA-Sequenzen aufweisen. Dazu zählen auch Deletionen, Inversionen, Additionen, Substitutionen, Insertionen sowie chemische und/oder physikalische Modifikationen oder Teile des Polypeptids im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird.

[0074] Die Erfindung soll nun weiter anhand der beigefügten Beispiele und Figuren erläutert werden, ohne durch diese eingeschränkt zu werden. Es zeigt:

[0075] Fig. 1 Schema der Primerpositionen zur Präparation der Vollängen der TZR- α -Kette;

[0076] Fig. 2 Darstellung der präparierten TZR-Ketten. Die Nomenklatur erfolgte für die variablen Segmente (V α /V β) nach Arden et al. ("Immunogenetics", 1995, 42: 501-530), für die J-Segmente und die Konstanten Domänen nach der Immunogenetics-Datenbank (<http://imgt.cines.fr:8104>). Die TZR-Ketten V α 3, V α 13, V β 3 und V β 3Cb0 sind, bezogen auf ihre Sequenz, produktiv; V β 1 hingegen weist einen Frame-Shift in der Rekombinationsregion V-D-J und ist nachfolgend nicht produktiv für ein TZR-beta-Ketten-Polypeptid. Cb0 stellt die durch alternatives Splicing entstandene Insertion dar. Die konstante Domäne der V β 1-Kette konnte keiner Subfamilie zugewiesen werden, da ausschließlich die trunkierte Form präpariert wurde und damit keine Differenzierung möglich war.

[0077] Fig. 3 Positionen der Primer zur Präparation der trunkierten TZR- β -Ketten im Rahmen der 5'-RACE-PCR.

[0078] Fig. 4 Darstellung des viralen Vektors pBullet AV03 zur Expression der Wildtyp(Wt)-murine(mu)-TZR-V α 3-Kette. Die Wildtyp-V α 3-Kette wurde, wie im Text beschrieben, über die Restriktionsenzymstellen NcoI und BamHI in den retroviralen Vektor pBullet kloniert.

[0079] Fig. 5 Darstellung der Wt-mu-TZR-V α 13-Kette, die über die Restriktionsenzymstellen NcoI und SalI, wie beschrieben, kloniert wurde.

[0080] Fig. 6 Darstellung der funktionellen Wt mu TZR V β 3, in den retroviralen Vektor pBullet kloniert.

[0081] Fig. 7 Ergebnis der durchflußzytometrischen Messung der mit dem leeren Vektor pBullet transduzierten PBMZ. Es konnte kein Transgen (V β 3) nachgewiesen werden.

[0082] Fig. 8 Darstellung der Expression des Transgens V β 3 als Marker für Rekonstitution der mu-TZR-Expression auf humanen PBMZ, die durchflußzytometrisch nachgewiesen werden konnte. Die Expression ist, wie erwartet, ausschließlich für Zellen, die zusätzlich den CD3-Komplex exprimieren, zu zeigen.

[0083] Fig. 9 Darstellung der Expression der Kombination V α 13V β 3 ähnlich Fig. 8; die Detektion des Transgens V β 3 läßt auf Rekonstitution der murinen TZR-Expression auf humanen PBMZ schließen.

[0084] Fig. 10 Durchflußzytometrische Darstellung mit V α 3V β 3 transduzierter, humaner PBMZ; gezeigt ist eine Anfärbbarkeit für HLA-A2.1-p53(264-272)-PE-Tetramer, die auf Expression eines p53(264-272)-spezifischen und HLA-A2.1-restringierten TZR auf den humanen PBMZ hinweist.

SEQ ID Nr. 1: "V α 3": produktive, funktionelle Maus- α -Kette (muV α -mu α); (siehe Fig. 2);

SEQ ID Nr. 2: "V α 13": produktive Maus- α -Kette (muV α -mu α); (siehe Fig. 2);

SEQ ID Nr. 3: "V β 1": nicht produktive, nicht funktionelle Maus- β -Kette (muV β -mu β); (siehe Fig. 2);

SEQ ID Nr. 4: "V β 3": produktive, funktionelle Maus- β -Kette (muV β -mu β); (siehe Fig. 2);

SEQ ID Nr. 5: "V β 3Cb0": splicing-Variante von V β 3 mit Cb0-Insertion vor Cb1; (siehe Fig. 2);

SEQ ID Nr. 6: Primer GSP-1 (rev_R_a_SP1)

SEQ ID Nr. 7: Primer GSP-2 (rev_R_a_SP2)

SEQ ID Nr. 8: Primer GSP-3 (rev_Asc_aTCR_c1.2)

SEQ ID Nr. 9: Primer GSP-4 (rev_Asc_bTCR_c2)

SEQ ID Nr. 10: Primer GSP-5 (rev_bTCR_c4)

SEQ ID Nr. 11: Primer GSP-6 (rev_Asc_bTCR_c6)

SEQ ID Nr. 12: V α 3: Primer Forward (for_Va3-NcoI_1)

SEQ ID Nr. 13: V β 3(Cb0): Primer Forward (for_Vb3-NcoI_1)

SEQ ID Nr. 14: V α 13: Primer Reverse (for_Va13-NcoI_1)

Beispiele

[0085] Die Präparation cytosolischer mRNA wurde unter der Verwendung des käuflich erhältlichen QIAprep Miniprep (QIAGEN, Hilden, Germany) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die 5'-RACE-PCR wurde unter der Verwendung des käuflich erhältlichen RACE-PCR-Kit (Roche Molecular Diagnostics) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die reverse Transkription wurde alternativ zur reversen Transkription innerhalb des RACE-PCR-Protokolls mit displayTHERMO-RT (Display Systems Biotech, Vista, CA, USA) durchgeführt. Zur Klonierung in die Vektoren pCR^{2.1}-TOPO[®] und pCR^{XL}-TOPO[®] wurden die entsprechenden Kits (Invitrogen, Niederlande) gemäß Protokoll des Herstellers verwendet. Die Zytotoxizitätstests erfolgten nach dem in Theohald et al. ("Targeting p53 as a general tumor anigen", 1995, "Proc. Natl. Acad. Sci.", USA 92, 11993-11997) beschriebenen Verfahren.

1. Klonierung der α -TZR-Ketten

[0086] Nach Extraktion der mRNA aus einem p53.264-272-spezifischen, HLA-A2.1-restringierten Maus-ZTL-Klon wurde über 5'-RACE-PCR (Boehringer Mannheim, Germany) mittels der selbst designten, Gen-spezifischen Primer (SEQ ID Nr. 6 bis SEQ ID Nr. 14) die Vollängen- α -TZR-Kette isoliert. Zur Erhöhung der Spezifität wurde das DNA-Intermediat (ca. 1100 Bp) vor der zweiten PCR (Nested PCR) aus einem Agarose-Gel präpariert. Die etwa 1000 Bp großen

Produkte wurden nachfolgend in das pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektorsystem nach Angaben des Herstellers kloniert und sequenziert.

- [0087] Die Orientierung der Primer und die Klonierung der alpha-Kette ist schematisch in Fig. 1 gezeigt. Die Gen-spezifischen Primer zur Amplifikation der gesamten, kodogenen Region der TZR- α -Kette wurden so gewählt, daß sie in der 3'-nicht-kodogenen Region (UTR) paarten. Der Gen-spezifische Primer GSP-3 (SEQ ID Nr. 8), der abschließend auf dem Stop-Codon paart, fügt durch seinen 5'-Überhang künstlich eine AscI-Site ein. Die Sequenzen der Genspezifischen Primer wurden durch Vergleich publizierter Maus-TZR- α -Ketten-Sequenzen und Auswahl geeigneter Bereiche ermittelt.

10

2. Klonierung der trunkierten TZR- β -Ketten

- [0088] Zur Klonierung der TZR- β -Kette wurde wie bei der α -Kette verfahren; jedoch konnten hier keine Gen-spezifischen Primer dienen, die außerhalb der codogenen Region paarten, da verschiedene Gene der konstanten Domäne der β -Kette existieren. Daher mußte ein 3'-trunkiertes Produkt generiert werden, wozu ebenfalls die 5'-RACE-PCR benutzt wurde, welches sequenziert wurde. Das Produkt der ersten PCR ergab in der Gelelektrophorese keine deutliche Bande, wurde aber dennoch aus dem Gel extrahiert und der Nested PCR zugeführt. Die resultierende Doppelbande wurde nachfolgend in das TOPO[®]-Vektorsystem (Invitrogen) kloniert.

15

3. Analyse der TZR-Ketten-Sequenzen

20

[0089] Durch Sequenzierung der PCR-Produkte konnten fünf verschiedene TZR-Ketten-kodierende Sequenzen unterschieden werden:

1. V α 3: produktive TZR- α -Kette, funktionell (SEQ ID Nr. 1);
2. V α 13: produktive TZR- α -Kette (SEQ ID Nr. 2);
3. V β 1: durch fehlerhaftes Rearrangement (V β 1 \rightarrow D beta: frameshift) nicht produktive β -Kette, nicht funktionell (SEQ ID Nr. 3);
4. V β 3: produktive β -Kette, funktionell (SEQ ID Nr. 4), und
5. V β 3C β 0: splicing-Variante von V β 3 mit C β 0-Insertion vor C β 1 (SEQ ID Nr. 5).

30

4. Klonierung der produktiven Ketten in das retrovirale Vektorsystem pBullet

- [0090] Aus den erhaltenen Sequenzen ließen sich für jede Kette Primer ableiten, die im 5'-Bereich paaren. Diese wurden derart modifiziert (siehe SEQ ID Nrn. 12–14), daß sich durch eine PCR eine NcoI-Site (CCATGG) um das Startcodon ATG einfügen ließ, wodurch im Fall der α -Ketten das zweite Basentriplett und dadurch die zweite Aminosäure modifiziert wurde.

- [0091] Zur Klonierung in den retroviralen Vektor pBullet wurde zunächst erneut mRNA revers transkribiert (displayTHERMO-RT, vgl. S. 20), diesmal jedoch mit einem oligo-dT-Primer (displayTHERMO-RT, vgl. S. 20), der im poly-A-tail der RNA paarte, wodurch ein reverses Transkript (einzelssträngige cDNA) der gesamten RNA entstand. Dieses diente in einer nachfolgenden PCR als Matrize.

40

4.1 Klonierung V α 3/13

- [0092] Die Klonierung der TZR- α -Ketten erfolgte nach oben beschriebener, reverser Transkription und PCR, in der die flankierenden NcoI- und SalI-Sites eingefügt wurden. pBullet und Insert wurden NcoI- und SalI-verdaut, und das Insert (V α 3/V α 13) wurde nach Standardmethodik einligiert. Nach Transformation kompetenter Bakterien wurden positive Klone sequenziert. Ein fehlerloser V α 13-Klon wurde für weitere Versuche gewählt. Da die Ausbeute verwertbarer Klone für V α 3 gering war und einer dieser bis auf einen Fehler im Stopcodon akzeptabel war, wurde dieser zur Rekonstitution des Stop-Codons nochmals in ein bestehendes Plasmid über eine NcoI-Austauschklonierung umklont, wobei die 3'-flankierende "site" in diesem Fall eine BamHI-spezifische war.

50

4.2 Klonierung V β 3

- [0093] Zur Klonierung der β -Kette (V β 3) wurde die kodierende Nukleinsäure nach der PCR abermals in den pCR[®]-XL-TOPO[®] kloniert, um von dort aus in den Vektor pBullet umklont zu werden. Dazu wurde ein geeigneter Klon selektiert und zunächst durch einen AscI-Verdau linearisiert. Gleichsam wurde der leere Vektor pBullet durch einen XhoI-Verdau linearisiert. Daraufhin wurden beide "sticky" geschnittenen Enden durch die T4-DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs zu "blunt"-Enden aufgefüllt. Dann erfolgte ein partieller NcoI-Verdau des V β 3-Klons, da WildtypTZR über eine interne NcoI-Site verfügen und diese bei jenem Verdau nicht geschnitten werden darf und gleichsam ein kompletter NcoI-Verdau des leeren Vektors. Nach Gel-Elektrophorese und Extraktion des NcoI-VolllängeV β 3-blunt und des blunt-pBullet-leer-NcoI-Fragments erfolgte die Ligation des Inserts und des Vektors. Mit dem Ligationsprodukt transformierte Bakterienklone wurden sequenziert.

60

65

5. Transduktion humaner PBMZ

- [0094] Nach Etablierung in den retroviralen Vektor pBullet inserierter Vollängen-TZR-Konstrukte wurden diese Plasmide nach dem Fachmann bekannten Methoden in Bakterienkulturen amplifiziert und präpariert. Diese wurden in Kom-

bination mit den für die Strukturproteine gag, pol und GALV-env kodierenden Plasmiden in die embryonale Nierenzelllinie 293T über $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektion transfiziert. Es wurden folgende Kombinationen transfiziert:

1 - pBullet + pHIT60 + pCOLT-GaLV

2 - pBullet AV03 + pBullet BV03 + pHIT60 + pCOLT-GALV

3 - pBullet AV13 + pBullet BV03 + pHIT60 + pCOLT-GALV

[0095] Diese transiente Transfektion (keine eingeführten Selektionsmarker) führte nach etwa 24 h zur Produktion von GALV-pseudotypisierten, retroviralen Partikeln, die durch Ko-Kultivierung der virusproduzierenden 293T-Zellen (2500 rad bestrahlt) mit OKT-3(α -hu CD3)-aktivierten, HLA-A2-positiven PBMZ gesunder Spender, zur Infektion dieser PBMZ genutzt wurden. Die Transduktionseffizienz wurde etwa eine Woche nach dreitägiger Kokultivierung und Expansion durch Durchflußzytometrie evaluiert, und nach weiterer Expansion konnte die lytische Reaktivität getestet werden.

6. FACS-Untersuchung transduzierter PBMZ

[0096] Zur Evaluierung der Transduktionseffizienz wurden Zellen mit der TZR-Ketten-Kombination $\text{V}\alpha 3\text{V}\beta 3$, $\text{V}\alpha 13\text{V}\beta 3$ und auch solche, die nur mit dem Expressionsvektor pBullet, der kein Transgen enthielt, mit der Technik der Durchflußzytometrie gemessen. Dazu wurden 106 Zellen laut Herstellerangaben mit 1 μg anti-muTCR-V $\beta 3$ -Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg) und anti-huCD3-Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen. Fig. 8 und 9 zeigen, daß sowohl die mit der Kombination aus $\text{V}\alpha 3\text{V}\beta 3$ als auch die mit der aus $\text{V}\alpha 13\text{V}\beta 3$ positiv für CD3 und muTCRV $\beta 3$ anfärbbar waren, was als Hinweis auf membranständige Expression des β -Ketten-Transgens hinwies. Nicht positiv für V $\beta 3$ -Oberflächen-Transgen hingegen war die Negativkontrolle pBullet ohne Transgen.

[0097] Um weiterhin die Rekonstitution der Antigenspezifität durchflußzytometrisch zu bestimmen, wurden 10^5 Zellen mit 0,375 μg A2-p53(264-272)-PE-Tetramer (60 Minuten auf Eis) und anti-huCD8-FITC (15 Minuten auf Eis) gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen. Exemplarisch ist die Färbung zuvor positiv für muTCR-V $\beta 3$ -FACS-sortierter, mit der Kombination $\text{V}\alpha 3\text{V}\beta 3$ transduzierter PBMZ gezeigt (siehe Fig. 10).

7. Zytolytische Aktivität transduzierter PBMZ

[0098] Die lytische Reaktivität retroviral transduzierter, humaner PBMZ wurde durch Zytotoxizitätstests evaluiert. Die transduzierten PBMZ wurden in einem Standard-Chromfreisetzungstest getestet, wobei zum einen peptidbeladene T2-Zellen, als auch die p53-Defektmulante Saos-2 und deren mut (143 V \rightarrow A) p53 Transfektante Saos-2/143 eingesetzt wurden. Die Zielzellen, die alle den HLA-A2.1-Phänotyp besaßen, wurden zusätzlich in zwanzigfachem Überschuß Nicht-Chrom-markierter K562-Zellen versetzt, die als sogenanntes "cold target" selektiv als NK-Zell-Zielzellen dienten und somit die unspezifische NK-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen verringerten. Das eingesetzte Verhältnis von Effektor-zu-Zielzellen (E : Z) war 30.

[0099] Es ist eine für das p53-Polypeptid spezifische Reaktion der mit der Kombination $\text{V}\alpha 3\text{V}\beta 3$ transduzierten PBMZ zu erkennen. Außerdem wird endogen prozessiertes und in Kontext von HLA-A2.1 präsentierte, p53-abgeleitete Peptid erkannt (Saos-2/143), was als notwendige Voraussetzung zur Lyse p53-überexprimierender Tumorzellen gilt. Eine Lyse der Negativkontrolle Saos-2 ließ sich für keine Effektorzellen zeigen. Nachfolgende Tabelle 1 stellt exemplarisch die gemessene, spezifische Lyse verschiedener Zielzellen dar. Weiter konnte eine spezifische Lyse maligner Zelllinien nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Tabelle 1

Zielzelle\Effektor	pBullet	$\text{V}\alpha 3\text{V}\beta 3$	$\text{V}\alpha 13\text{V}\beta 3$
T2+FluM1	9	20	19
T2+p53.264-272	6	88	5
Saos-2	4	6	7
Saos-2/143	1	31	4

Angaben in % spezifischer Lyse, Verhältnis E:Z = 30:1

<110> Stanislawski, Thomas

5 <120> Polypeptide eines p53-Protein spezifischen, murinen
alpha/beta T-Zell Rezeptors, diese kodierende
Nukleinsäuren und deren Verwendung

10 <130> umai30001-P53

<140>

<141>

15 <160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 269

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 1

Met Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg
1 5 10 15

30 Asp Ala Gln Ala Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
20 25 30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
35 40 45

35 Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
50 55 60

40 Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
65 70 75 80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
85 90 95

45 Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
100 105 110

50 Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu
130 135 140

55 Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe
145 150 155 160

Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile
165 170 175

60 Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn
180 185 190

65 Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile
195 200 205

Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp
 210 215 220
 Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe
 225 230 235 240
 Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 245 250 255
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265

 <210> 2
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 2
 Met Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp Gly Met Ser Gln Gly Glu Gln Val
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Pro Ser Ile Leu Arg Val Gln Glu Gly Ser Ser Ala Ser
 20 25 30
 Ile Asn Cys Ser Tyr Glu Asp Ser Ala Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr
 35 40 45
 Lys Gln Glu Pro Gly Glu Asn Pro Lys Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser
 50 55 60
 Asn Met Glu Arg Lys Gln Ile Gln Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Lys Ala Lys Arg Phe Ser Leu His Ile Thr Asp Thr Gln Pro Gly Asp
 85 90 95
 Ser Ala Met Tyr Phe Cys Ala Ala Ile Phe Gly Gly Ser Asn Ala Lys
 100 105 110
 Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Lys Ser Asn Ile Gln
 115 120 125
 Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp
 130 135 140
 Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro
 145 150 155 160
 Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp
 165 170 175
 Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn
 180 185 190
 Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr
 195 200 205
 Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser
 210 215 220
 Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly

225 230 235 240
 Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr
 5 245 250 255
 Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260
 10
 <210> 3
 <211> 131
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 Met Ser Cys Arg Leu Leu Tyr Val Ser Leu Cys Leu Val Glu Thr
 20 1 5 10 15
 Ala Leu Met Asn Thr Lys Ile Thr Gln Ser Pro Arg Tyr Leu Ile Leu
 20 25 30
 25 Gly Arg Ala Asn Lys Ser Leu Glu Cys Glu Gln His Leu Gly His Asn
 35 40 45
 Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Glu Lys Pro Pro Glu Leu Met
 30 50 55 60
 Phe Leu Tyr Asn Leu Lys Gln Leu Ile Arg Asn Glu Thr Val Pro Ser
 65 70 75 80
 35 Arg Phe Ile Pro Glu Cys Pro Asp Ser Ser Lys Leu Leu Leu His Ile
 85 90 95
 Ser Ala Val Asp Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser
 100 105 110
 40 Pro His Arg Gly Thr Met Leu Ser Ser Ser Ser Asp Gln Gly His Asp
 115 120 125
 Ser Pro Ser
 45 130
 50 <210> 4
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55 <400> 4
 Met Ala Thr Arg Leu Leu Cys Tyr Thr Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
 60 20 25 30
 Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His
 35 40 45
 65 Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe
 50 55 60

Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
 65 70 75 80
 Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
 85 90 95
 Glu Ile Gln Ser Ser Glu Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
 130 135 140
 Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
 145 150 155 160
 Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
 165 170 175
 Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
 180 185 190
 Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
 195 200 205
 Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
 210 215 220
 Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly
 245 250 255
 Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu
 260 265 270
 Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
 275 280 285
 Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Lys Lys
 290 295 300
 Asn Ser
 305

<210> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Met Ala Thr Arg Leu Leu Cys Tyr Thr Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His

35 40 45
 5 Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe
 50 55 60
 Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
 65 70 75 80
 10 Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
 85 90 95
 Glu Ile Gln Ser Ser Glu Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 15 Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 20 Arg Leu Thr Val Val Gly Leu Arg Leu Ser Tyr Ala Ser His His Ser
 130 135 140
 Ser Leu Thr Ser Gln Cys Arg Ser Glu Cys Gly Thr Ser Glu Asp Leu
 145 150 155 160
 25 Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala
 165 170 175
 30 Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly
 180 185 190
 Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu
 195 200 205
 35 Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn
 210 215 220
 Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp
 225 230 235 240
 His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu
 245 250 255
 45 Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln
 260 265 270
 Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser
 275 280 285
 50 Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile
 290 295 300
 55 Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val
 305 310 315 320
 Val Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
 325 330
 60

<210> 6
 <211> 20
 65 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 6		
ctctccagca accttcctca	20	
<210> 7		5
<211> 20:		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		10
<400> 7		
ggctcctttt ggcttgaaga	20	
<210> 8		15
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		20
<400> 8		
aggcgcgcct tcaactggac cacagcctca gcgt	34	
<210> 9		25
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		30
<400> 9		
aggcgcgcct tcaggaatty ttttyttga ccat	34	
<210> 10		35
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		40
<400> 10		
ggatctcata gaggatggt	19	
<210> 11		45
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		50
<400> 11		
aggcgcgcct ggccacttgt cctcctctga a	31	
<210> 12		55
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		60
<400> 12		
agcatgccat ggtcctggcg ctcct	25	
<210> 13		65
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		

<400> 13
agcatgccat ggctacaagg ctctct

27

5

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Mus musculus

10

<400> 14
agcatgccat ggttctatgg ctgca

25

15

Patentansprüche

1. Polypeptid eines α/β -T-Zell-Rezeptors gemäß SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
2. Fusionsprotein, umfassend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die ζ -Region von CD3 und/oder CD8, CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 und/oder CD8, CD16 oder Teile davon.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 2 oder 3, weiterhin einen flexiblen Linker umfassend, insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃.
5. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein chimäres, zumindest partiell humanisiertes Fusionsprotein handelt.
6. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Einzelketten- oder Doppelketten-T-Zell-Rezeptor handelt.
7. α - oder β -Kette eines T-Zell-Rezeptors, der die Antigen-Erkennungssequenz eines für die Aminosäuren 264–272 des Proteins p53 oder eines Komplexes von p53 264–272 und HLA-A2-spezifischen Antikörpers umfaßt.
8. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid synthetisch hergestellt worden ist.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA, ist mit einer Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 18 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden ist.
10. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist.
11. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2, 9 oder 10 in Form ihrer komplementären "antisense"-Sequenz.
12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure synthetisch hergestellt worden ist.
13. Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle-Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, retroviralen Vektors, adenoviralen Vektors oder Partikels und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9 bis 12.
14. Wirtszelle, transfiziert mit einem Vektor oder infiziert oder transduziert mit einem Partikel gemäß Anspruch 13.
15. Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine T-Zelle oder eine T-Vorläuferzelle oder eine Stammzelle handelt.
16. Wirtszelle nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf ihrer Oberfläche ein Polypeptid oder Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 exprimiert.
17. Verfahren zur Identifizierung von p53-Protein-spezifischen Antigenen, dadurch gekennzeichnet, daß p53-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer Wirtszelle gemäß Anspruch 16 unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysiert werden, wenn der Tumor das p53-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das präsentierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.
18. Verfahren zur Herstellung eines gegen ein Polypeptid, Fusionsprotein oder eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 gerichteten Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose, Behandlung und/oder Überwachung der Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen und/oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem Polypeptid oder funktionellen Äquivalenten davon oder Teilen davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren, nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder diese kodierende Nukleinsäuren immunisiert wird.
19. Antikörper, hergestellt gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gerichtet ist.
20. Rekombinanter Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er die Antigen-Erkennungssequenz der α - oder β -Kette eines für die Aminosäuren 264–272 des Proteins p53 oder eines Komplexes von p53 264–272 und HLA-A2-spezifischen T-Zell-Rezeptors umfaßt.
21. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen,

dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

22. Arzneimittel zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. 5

23. Verwendung eines Arzneimittels nach Anspruch 22 zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

24. Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird. 10

25. Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. 15

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

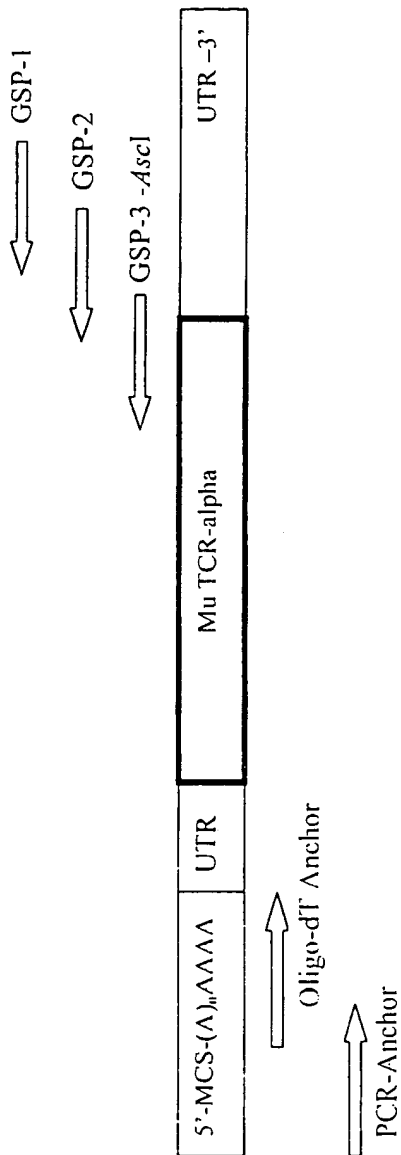
50

55

60

65

- Leerseite -



FIGUR 1

FIGUR 2

V α 3 (SEQ ID Nr. 1) :

V α 3	J α 33	C α
--------------	---------------	------------

V α 13 (SEQ ID Nr. 2) :

V α 13	J α 42	C α
---------------	---------------	------------

V β 1 (SEQ ID Nr. 3) :

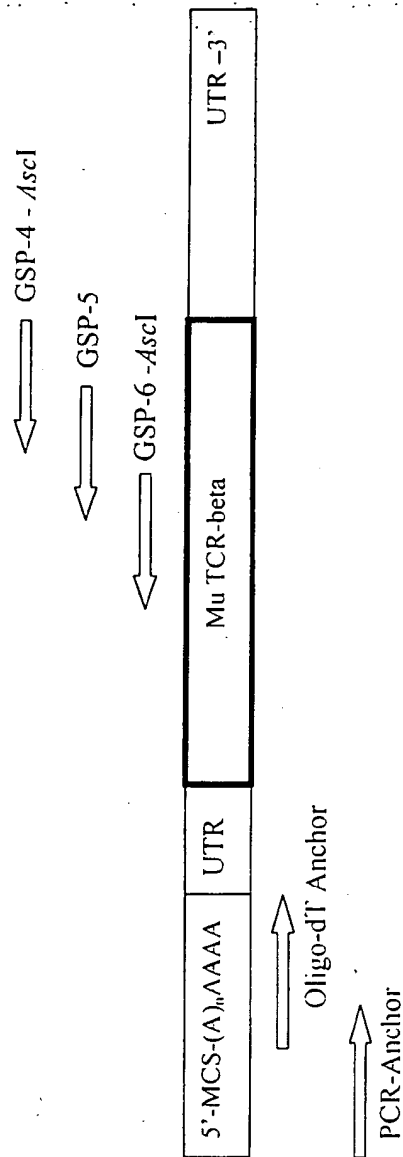
V β 1	D	J β 2.1	C β
-------------	---	---------------	-----------

V β 3 (SEQ ID Nr. 4) :

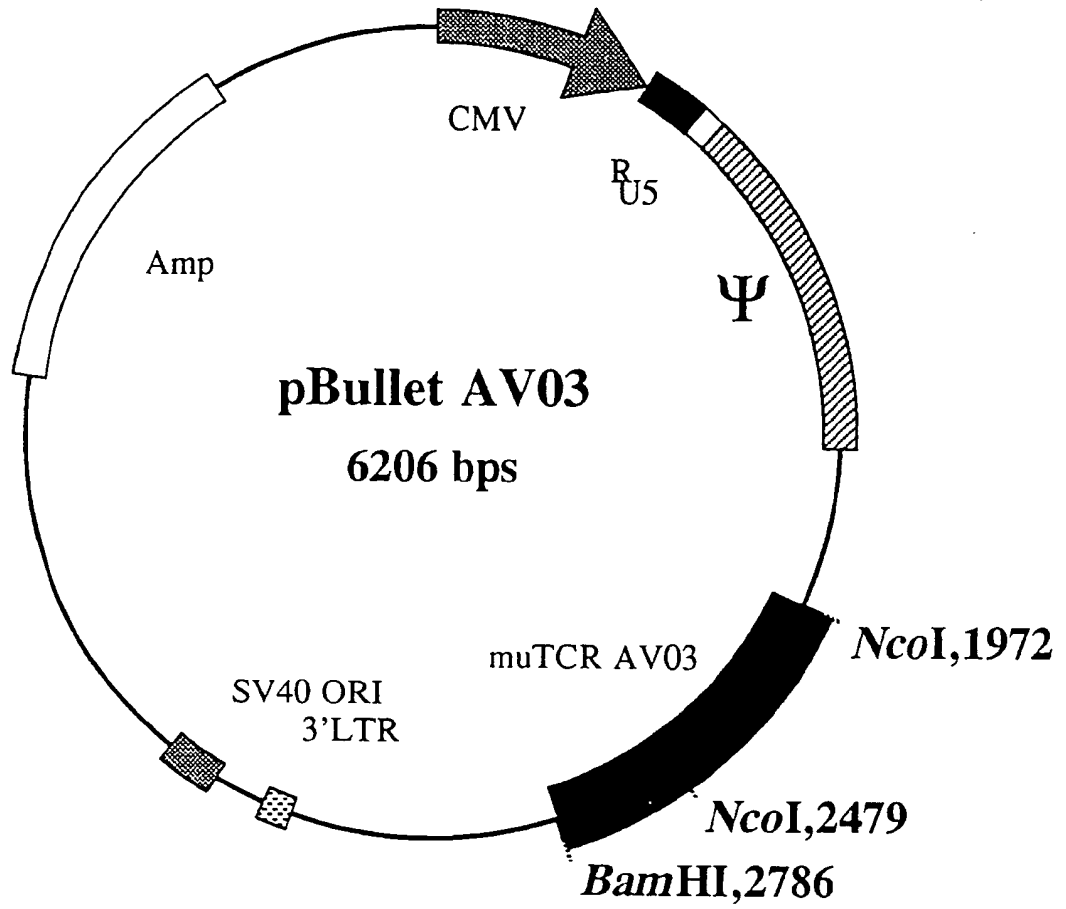
V β 3	D	J β 1.1	C β 1
-------------	---	---------------	-------------

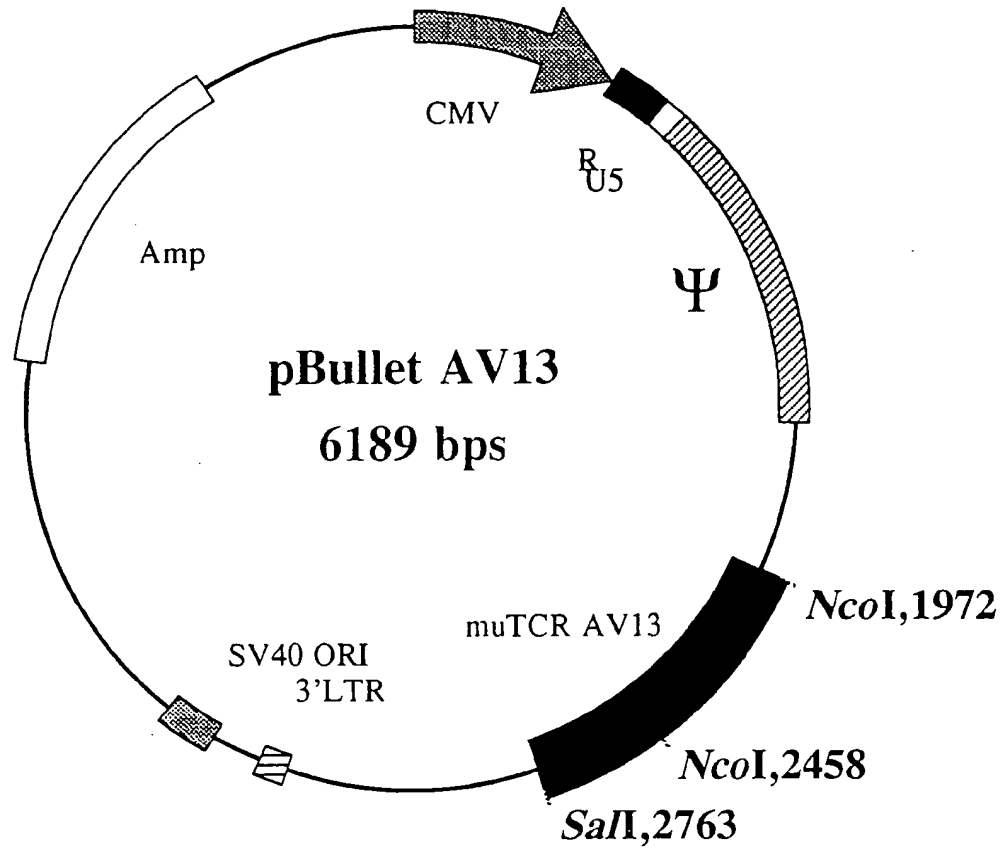
V β 3C β 0 (SEQ ID Nr. 5) :

V β 3	D	J β 1.1	C β 0	C β 1
-------------	---	---------------	-------------	-------------

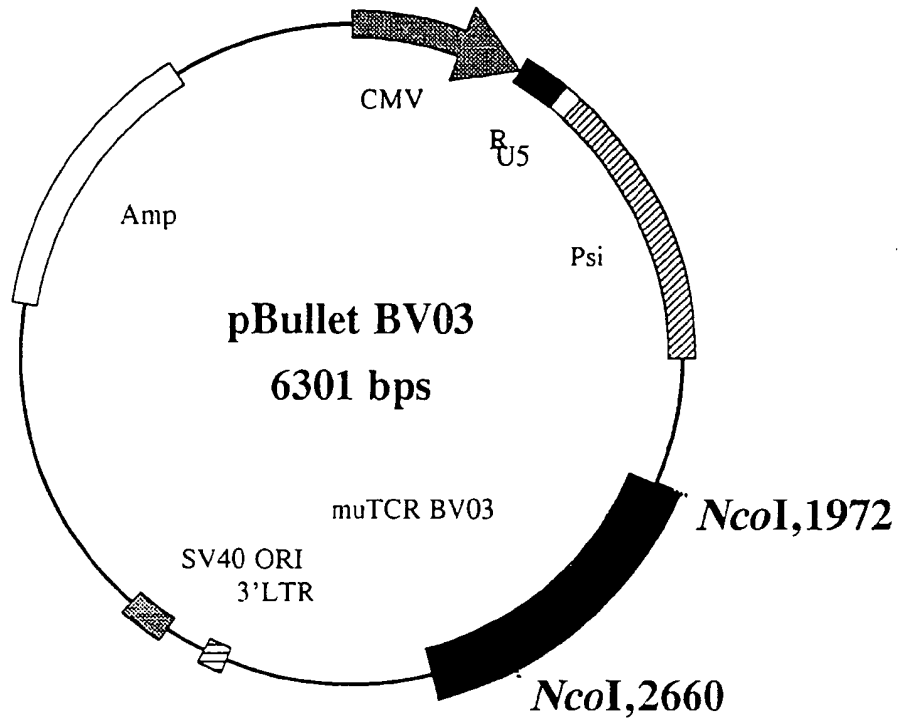


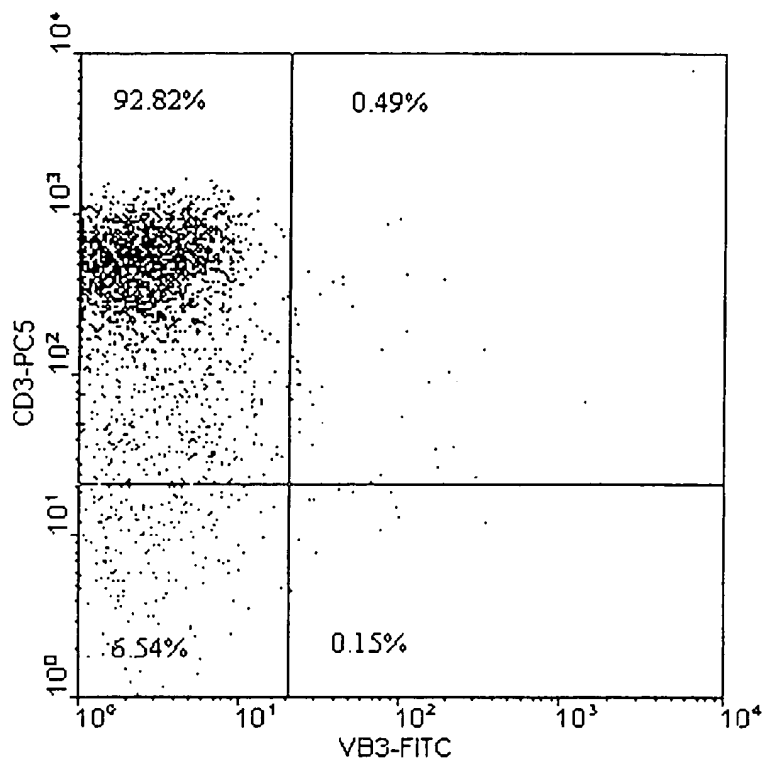
Figur 3





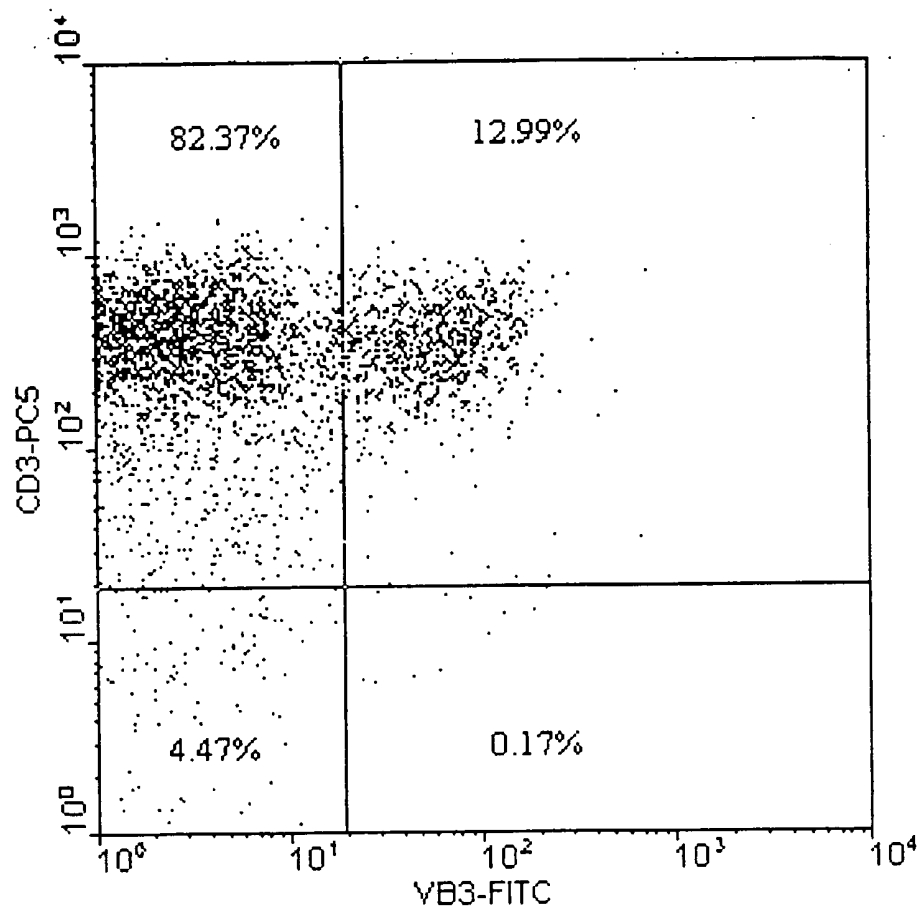
Figur 5





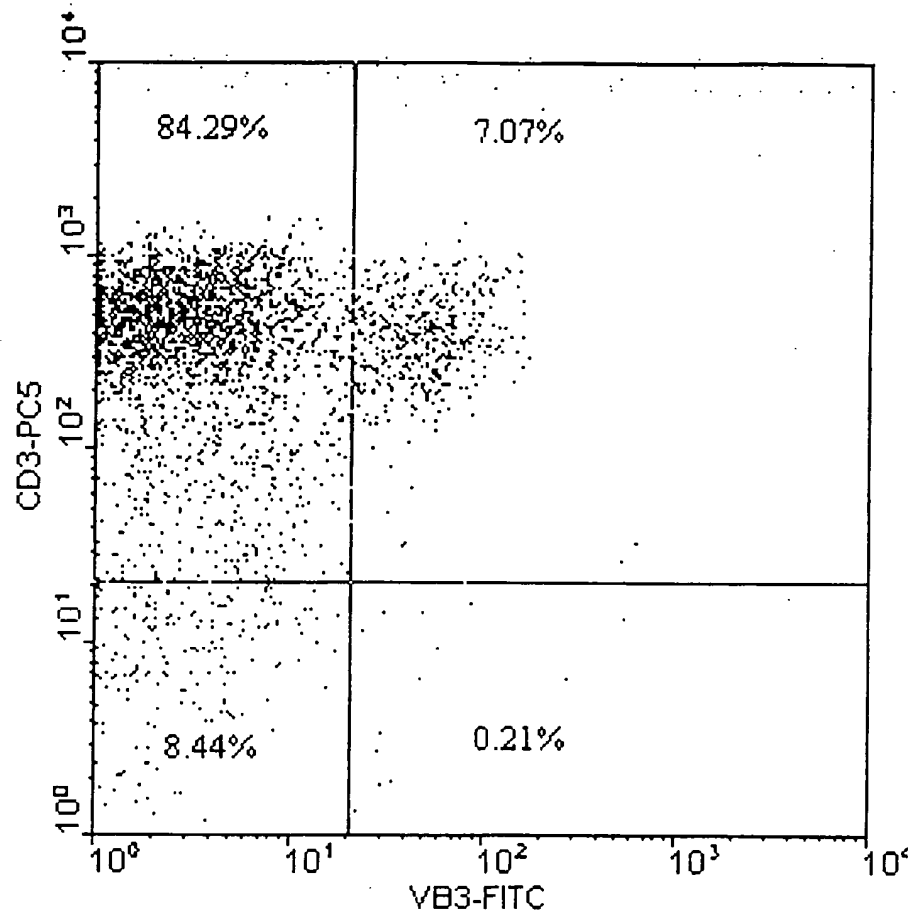
Figur 7

BEST AVAILABLE COPY



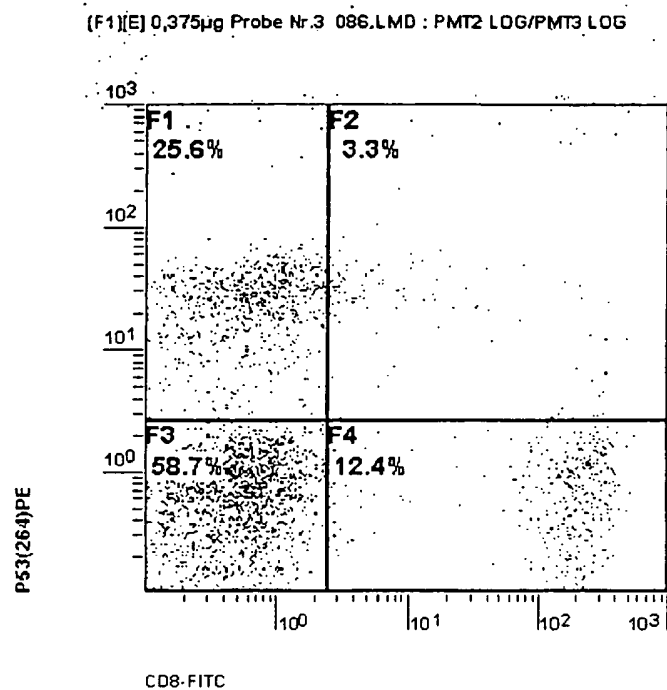
Figur 8

BEST AVAILABLE COPY



Figur 9

BEST AVAILABLE COPY



Figur 10

BEST AVAILABLE COPY